

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-505524

⑬ 公表 平成5年(1993)8月19日

⑭ Int. Cl. ¹	⑮ 識別記号	⑯ 庁内整理番号	⑰ 審査請求 未請求	⑱ 国際公開番号	⑲ 国際公開日
A 23 J 3/34	Z NA	7238-4B	千両審査請求 有	WO91/13554	平3(1991)9月19日
A 23 L 1/335		8214-4B			
C 07 K 15/02		8519-4H			

(全 11 頁)

⑳ 発明の名称 タンパク質加水分解物

㉑ 特 願 平3-506279

㉒ 出 願 平3(1991)3月8日

㉓ 翻訳文提出日 平4(1992)9月8日

㉔ 国際出願 PCT/DK91/00069

㉕ 国際公開番号 WO91/13554

㉖ 国際公開日 平3(1991)9月19日

㉗ 優先権主張 ㉘ 1990年3月9日㉙ デンマーク(DK)㉚ 633/90

㉛ 発 明 者 ダンブマン、クラウス

デンマーク国、デーコー-2860 ソエボルグ、7 テーホー、ホ
エイエ グラドサクセ 81㉜ 出 願 人 ノボ ノルディスク アクティ
ーゼルスカプデンマーク国、デーコー-2880 バグスバエルト、ノボ アレ
(普通なし)

㉝ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外3名

㉞ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR
(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), S
E(広域特許), US

最終頁に続く

10 要 約

1. G I u 及び/又は A s p 割合でのタンパク質の限定された特異的な加水分解を得るための方法であって、以下の特徴を有する群衆:

- (a) これはグルタミン酸(G I u)及びアスパラギン酸(A s p)残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである;
- (b) これは1 g の酵素タンパク質当たり少なくとも2.5 cps (本明細書にて定義する)の比活性を有する;
- (c) これは約23,600の分子量上の分子重を有する;
- (d) これはジイソプロピルオクタフルオリドによって阻害されるが、フェニルメタンスルホンフルオリドによって阻害されない;
- (e) これは6.5~10.0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す;

を含んで成り、その他のタンパク質分解活性も實質的に有さない酵素調製品をタンパク質性物質に加え、次いで所望の加水分解の程度(本発明にて定義される)が得られるまで中途又は強いアルカリ性のpHにてインキュベーションし、その後酵素を適切に不活性化せしめることによってこのインキュベーションを終了させ、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、前記方法。

2. タンパク質分解酵素が、微生物、特に細菌によって産生されるものである請求の範囲第1項記載の方法。

3. 細菌がB. リシエニホルニス(Bacillus licheniformis)の菌株を含む、ペナシリシエニホルニス(Penicillium licheniformis)の株である請求の範囲第2項記載の方法。

4. タンパク質分解酵素が、図4に示されるアミノ酸配列、又はその誘導体を含む請求の範囲第1~3項のいずれかに記載の方法。

5. pHを、タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーション中、一定に保持する、請求の範囲第1項記載の方法。

6. タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーションを、昇温プロセス(陰)によって行う、請求の範囲第1項記載の方法。

7. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば魚類タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白、卵黄もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、豆類タンパク質、むらさきうなぎタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の炭タンパク質又はごまの炭タンパク質から成る群から選ばれる、請求の範囲第1項記載の方法。

8. タンパク質性物質に加えられる酵素調製品の量が、0.05~1.5 cps /タンパク質100 g、特に0.1~5 cps /タンパク質100 gの範囲内にある、請求の範囲第1項記載の方法。

9. 酵素、インキュベーション混合物の温度を約70℃に保つことにより、又はインキュベーション混合物のpHを約5.0未満に下げることにより不活性化し、請求の範囲第1項記載の方法。

10. 第一のタンパク質分解酵素に加え、他のタンパク質分解酵素をタンパク質性物質に加える、請求の範囲第1~9項のいずれかに記載の方法。

11. 他のタンパク質分解酵素が、トリプシンおよびトリプシン-プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求の範囲第10項記載の方法。

12. 第一のタンパク質分解酵素が、0.05~5 cps /タンパク

- 1 -

BEST AVAILABLE COPY

質 100g の範囲内の量で加えられ、さらに第二のタンパク質分解酵素が 0.1 ~ 1.0 cps /タンパク質 100g の範囲内の量で加えられる、請求の範囲第 13 項記載の方法。

13. タンパク質加水分解物であって、以下の特徴を有するタンパク質分解物：

- (a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；
- (b) これは 1g の酵素タンパク質当たり少なくとも 25 cps (本明細書にて定義する) の比活性を有する；
- (c) これは約 23,500 の見かけ上の分子量を有する；
- (d) これはジイソプロピルネオペンタフルオリドによって阻害されるが、フェニルメチルスルホニルフルオリドによって阻害されない；
- (e) これは 6.5 ~ 10.0 の pH の範囲においてその最大活性の 75% 以上を示す；

を含んで成り、その他のタンパク質分解酵素を本質的に有さない酵素組成品によるタンパク質の Glu 及び / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドより本質的に成る、断片タンパク質加水分解物。

14. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば乳類タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、赤血球、卵白もしくは卵黄タン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはホセイン、なたねタンパク質、むらさきまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、納豆タンパク質又はごまの葉タンパク質から成る群から選ばれ、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

明 細 書

タンパク質加水分解物

発明の分野

本発明はタンパク質の限定された特異的な加水分解を得る方法、この方法によって得られるタンパク質加水分解物、及びこのタンパク質加水分解物を含む食品に関する。

発明の背景

プロテアーゼによるタンパク質の酵素的加水分解は多くのタンパク質の製造物を提供するタンパク質加水分解物を製造する、良質に確立された方法であり、従ってこの方法は通常の食品に存在する十分な量の全長タンパク質を摂取もしくは消化できない一定の患者の食糧において有利に利用されようか、又は状況のためのミルク代替品の栄養価を向上せしめるために利用されよう。更に、タンパク質加水分解物ヒトの栄養食品のために伝統的に利用されている起源から調製されることができ、そして例えばそれ自体の食品として又は他の食品への添加剤のいずれかとして利用されよう。

今日このタイプのタンパク質加水分解物の調製のために利用されているプロテアーゼは、広い特異性を有するプロテアーゼ、例えばバチルス *Bacillus* (Bacillus *sp.*) フルリ性プロテアーゼである。広い特異性を有するプロテアーゼを用いたときに出くわす主要な問題は、しばしば生成されるタンパク質加水分解物の強い苦味にある。この苦味は、懸濁された疎水性アミノ酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、疎水性側鎖を有するアミノ酸でのタンパク質の切断の結果である。全長タンパク質又は長

特 許 平 5-505524 (2)

断物。

15. 高い比率の 1000 ~ 20,000 の範囲、好ましくは 1000 ~ 10,000 の範囲における分子量を有するペプチドと、低い比率の約 1000 未満の分子量を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

16. タンパク質の Glu および / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質の Leu および / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての C-末端に Leu および / または Asp 残基を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

17. 高い比率の分子量 1000 ~ 10,000 を有するペプチドおよび低い比率の分子量約 1000 未満を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 16 項記載のタンパク質加水分解物。

18. 請求の範囲第 13 ~ 15 項のいずれかに記載のタンパク質加水分解物を含んで成る食品。

19. 請求の範囲第 16 又は 17 項記載のタンパク質加水分解物を含んで成る食品。

20. 1 種類以上の脂肪源および / または 1 種類以上の炭水化物源を、更に含んで成る、請求の範囲第 18 又は 19 項記載の食品。

めのペプチドにおいて、この疎水性側鎖は、折り込まれているタンパク質内にこの側鎖がかくれてしまうタンパク質分子の三次構造に依って決定し、小分子のペプチドがタンパク質分子のタンパク質分解の切断によって形成されたなら、この疎水性側鎖は暴露され、従って近づく表面の疎水性及び親水性レセプターに受けられやすくなる。この現象が苦味を生じせしめることが分っている (H. Wieser and H.-D. Belitz, *Z. Lebensw. Unters. Forsch.*, 1995, 頁 65 ~ 72; 及び H. Wieser and H.-D. Belitz, *Z. Lebensw. Unters. Forsch.*, 1990, 1995, 頁 303 ~ 302、を参照のこと)。

このタンパク質加水分解物の苦味の問題を、出発タンパク質の加水分解の程度を限定すること、即ち、プロテアーゼによって切断されるペプチド結合の数を限定すること、例えば加水分解の程度をモニターし、そして適切な加水分解の程度が得られたならこのタンパク質分解反応を止めること (例えば、J. Adler-Nissen, *Enzymic Food Science of Food Proteins*, Applied Science Publishers, London, 1986 を参照のこと) によって解決することが提案されている。このような加水分解物は、少なくともそれらが含まれている食品の他の構成成分と一緒に、弱められた苦味を示すことが見い出されている。

加水分解の程度をコントロールするその他の方法は、タンパク質分子を一定の pH 環境でのみ切断する特異的なプロテアーゼを利用することにある。これは J.-B. Chobert の *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 頁 220 ~ 224 に記載され、これにはタンパク質をグルタミン酸及びアスパラギン酸残基にて特異的に加水分解せしめる *Staphylococcus aureus* (S1490, 参照) のプロテアーゼの利用が報告されている。

特表平5-505524 (4)

の態様において、このタンパク質性材料とこの酵素調製品とのインキュベーション中にpHを一定に保つことが好ましい。これにこのインキュベーション混合物を塩基、例えばNaOH、KOH、Ca(OH)₂、又はNH₃によって調整することによって行われうる。pHのモニター及び決定はpHメータにおいて自動的に行うのが好都合でありうる。

他の特定の態様において、非pHメータ法、即ち、このタンパク質性材料とこの酵素調製品のインキュベーションの際にpHを一定に保たせない加水分解を行うことが好ましい。この態様において、加水分解の程度は加水分解の際の機殻圧の上昇を決定することによって容易に追跡することができる。

本方法によって有利に加水分解されうるタンパク質性物質は従来の文献における加水分解のために挙げられている任意のタンパク質又はタンパク質性物質でありうる。適当なタンパク質性物質は動物性タンパク質、たとえば乳タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、なたねタンパク質、むらさきまごや大豆タンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、鶏の蛋タンパク質又はごまの蛋タンパク質である。

十分な加水分解の程度を得るため、このタンパク質加水分解酵素をこのタンパク質性物質に、0.05-1.5cpm/タンパク質100g、特に0.1-5cpm/タンパク質100gの量において加えることが適当でありうる。確立されている方法に従い、このタンパク質分解酵素を、このインキュベーション混合物の温度を約70度以上に高めることにより、又はこのインキュベーション混合物のpHを約5.0以下に下げることにより不活性化せしめることが適当

でありうる。

上記に定義したタンパク質分解酵素単独で得られるものより高い加水分解の程度、即ち、酵素pH値で可溶性であるより高い濃度のペプチドを必要とする目的に照して、驚くべきことにこのタンパク質性物質に他のタンパク質分解酵素を加えることが有利であることが見出された。この異なるタンパク質分解酵素は、上記に定義したタンパク質分解酵素と同様に、親水性アミノ酸、特にロイシン又はアラニン以外の親水性アミノ酸に特異的なものであることが好ましい。適切な異なるタンパク質分解酵素の例はトリプシン及びその他のトリプシン-様プロテアーゼである。トリプシンはシェン及びAres強毒でのペプチド結合を特異的に切断するプロテアーゼである。

「トリプシン-様プロテアーゼ」なる語は、トリプシンに似た特異性を有するプロテアーゼを意味することを意図している。適当なトリプシン-様プロテアーゼはフアラウム(Furukawa) (例えばWO89/06279に開示されている) 種から得ることができ、プロテアーゼである。

このタンパク質性物質を第1のタンパク質分解酵素及び異なるタンパク質分解酵素の両方によって加水分解せしめるとき、このタンパク質性物質に加えられた酵素の対当の量は、第1のタンパク質分解酵素に関しては、0.5-5cpm/タンパク質100gであり、そして異なるタンパク質分解酵素に関しては、0.1-10cpm/タンパク質100gの範囲であることが適切である。

他の観点において本発明は、以下の特徴を有するタンパク質分解酵素：

(a) これはグルタミン酸(Glu)及びアスパラギン酸(Asp)残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；

(b) これは1gの酵素タンパク質当たり少なくとも25cpm (※

明細書にて定義する) の比活性を有する；

(c) これは約23,600の分子量を有する；

(d) これはジイソプロピルホルスホフルオリートによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない；

(e) これは6.5-10.0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す；

を合んでおり、その他のタンパク質分解酵素を本質的に有さない酵素調製品によるタンパク質のGlu及び/又はAsp結合の特異的な加水分解の結果としての、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドより本質的に成るタンパク質加水分解物に到達する。

適切なタンパク質の選択は、タンパク質の加水分解に通常用いられる任意のタンパク質性物質、例えば前記したもの又はその組合せでありうる。

本発明に従い、相対的に高い比率の高分子量ペプチド及び相対的に低い比率の低分子量ペプチドを有するタンパク質加水分解物は、高い比率で低分子量ペプチドを含む加水分解物よりも容易に弱い旨味を有することが見出された。上記に定義した特定のタンパク質分解酵素を用いることにより得られる限定された特異的な加水分解は、この好ましい微量範囲におけるペプチドを提供するのに好ましく適する。従って、本発明のタンパク質加水分解物は、高い比率の1000-20,000の範囲、特にしくは1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと、低い比率の約1000未満の分子量を有するペプチドを合んで成ることが好ましい。

特定の観点において本発明は、タンパク質のGlu及び/又はAspの結合での特異的な加水分解の結果としてのC-末端にグルタ

ミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質のLeu及び/又はArgの結合での特異的な加水分解の結果としてのC-末端にLeu及び/又はArg残基を有するペプチドを含んで成るタンパク質加水分解物に関する。このタンパク質加水分解物は、加水分解物の高い程度の加水分解を必要とする目的、例えばタンパク質濃縮物としての飲料に加水分解物を含有することを目的とするときに特によく適する。前記した通り、加水分解の程度の上昇はタンパク質性物質を他の特異的なプロテアーゼ、例えばトリプシンによって加水分解せしめることによって適宜に得られうる。この場合において、この加水分解物は、高い比率の1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと低い比率の約1000以下の分子量を有するペプチドを適切に合んで成りうる。

更なる観点において本発明は、本発明のタンパク質加水分解物を食んで成る食品に関する。このタンパク質加水分解物はGlu/Asp特異的なプロテアーゼ処理により調整されたものであっても、又は前記した通りLeu/Arg特異的なプロテアーゼによる異なる加水分解によって調整されたものであってもよい。タンパク質加水分解物を含む食品は先行の文献から周知であり、これらの中にはこの加水分解物の存在によって生ずる苦味の問題も記載されている。

本発明の重要な食品は、虚弱な患者であって通常の食料を介しては限られた必須栄養をほとんど又は全く摂取できない者のための食料栄養である。このような食品において、本発明のタンパク質加水分解物はしばしば唯一のタンパク質性成分となることがあり、なぜなら本発明のタンパク質加水分解物の苦味のなきは、このタイプの食品における含有物として特に注意されるからである。食料栄養製品はしばしば液体又は半液体であるため、それに含まれるタンパク質加水分解物は高濃度の可溶性ペプチドを含むことが好ましい。

特表平5-505524 (5)

従って、高い収量の可溶性ペプチドを得るため、タンパク質性出発物質をGlu/Asp特異的プロテアーゼ及び前記したLys/Ars特異的プロテアーゼの両方によって加水分解せしめることにより、調整したタンパク質加水分解物を含むことが好ましい。

食品に含まれるタンパク質加水分解物の量は典型的には1~30重量%の範囲であろう。他方、本発明の食品用食品は米国特許第4,100,024号又はヨーロッパ特許明細書第248,747号に詳細の通りに実質的に作られうる。従って、この製品は更に脂肪及び/又は炭水化物の適当な組成を含むうる。脂肪の適当な組成は例えば植物油(例えばトウモロコシ又はヒマワリ油等)でありうる。炭水化物の適当な組成は例えばスクロース又はラクトース、加水分解デンプン、マルチデキストン等でありうる。食料製品は通常の添加剤、例えば風味料、甘味料、ビタミン、ミネラル及び微量元素を含んで成りうる。

本発明の他の重要な食品は幼児のためのミルク代替品である。このミルク代替品はこのタイプの製品に関する先行文献(例えばEP 322,589号)において示されているのと実質的に同じ方法であるが、但し既知の製品に含まれているタンパク質加水分解物を本発明のタンパク質加水分解物に代えて作られうる。このタイプの製品において、本タンパク質加水分解物の香味の存在は明らかに好都合であり、なぜなら幼児は香味を有するミルクを非常に嫌うからである。この場合においても、Glu/Asp特異的プロテアーゼ及びLys/Ars特異的プロテアーゼの両方による出発タンパク質の加水分解によって作られる加水分解物を含むことが好ましいことがある。本発明の加水分解物は低アレルギー性ミルク代替品の有利に含まれることができ、この加水分解物は成長ミルクタンパク質よりも有意に低いアレルギー性を有する。

($\text{Ca} = \text{m} \text{NaOH}$; $\text{m} = \text{m} \text{Pa}$; $\text{a} = \text{m} \text{O} \text{m} / \text{kg}$)。

本発明を、本発明の範囲を何ら限定することを見做さない以下の表において更に説明する。

例1

バチルス リジエンホルムス SP 446 プロテアーゼの精製及び SP 446 プロテアーゼの吸着

アルカラーゼ (Alcalase; 商標) PPA1615を米国特許第4,266,031号に詳細の通りに精製した。精製したSP 446 プロテアーゼの収率は、蛋白質としてC12-Phenol-Lau-Gluc-PNA (Doeberinger Mannheim)を用い、出発及び精製SP 446 プロテアーゼの酵素活性を測定することによって決定した。この酵素源製品において存在するスブチリシンAを不活性化せしめるためにフェニルメタンスルホニルフルオリド(1:10容重)を加えることが必要であり、なぜならスブチリシンAは明らかにPhenol又はSulの働きを切断せしめることによってこの基質を分解することができるからである。出発物質(40ml)の酵素活性はパーキン-エルマーラウンダー(Parkinson-Lamer, Lamda)リーダーにおいて405nm/2min./41での吸光度として測定され、そして165、920であると決定された。精製物質(3ml)の酵素活性を同様に測定し、そして153、720と決定された。従って、SP 446 プロテアーゼの収率は95%であった。

タンパク質加水分解性

SP 446 プロテアーゼのタンパク質加水分解活性を、苦質としてカゼインを用いて測定し、27cpc/gを得た。1カゼインプロテアーゼ単位(cpc)は、以下に記載する如く、標準条件下、毎分至1アミノ基の1ミラモルを放出する酵素の量(セリン標準との比較に

本発明の食品は、食品添加物として、又はこの食品に他の性質が提供されるために本発明のタンパク質加水分解物を含むこととなる。従って、この食品に含まれるタンパク質加水分解物は例えば、正牌せしめたい食品を本発明の方法によってGlu/Asp特異的プロテアーゼによって処理せしめることにより、音から得られるスクラップ肉(例えば、機械的に回収せしめた肉、即ち、屠殺場において屠殺した動物から取り取った通常の肉片の後に残っている骨上の肉)一般的な方法のより詳しい説明については、本出願人の同時係属特許出願PCT/DK89/000272を参照のこと)に基づいてよい。次いで、得られたタンパク質加水分解物を適切にミニミート製品、例えばソーセージ又はベーコンに加えてよい。

本発明の食品は、タンパク質内容物の一部又は全てが植物及び/又は肉類タンパク質に基づくタンパク質加水分解物より成るベビーフード製品であることもできる。

図面の簡単な説明

本発明を添付した図面を参照しながら以下の例において更に説明し、ここで：

図1は、SP 446 プロテアーゼのpH活性を示し；

図2は、トリポリリン酸ナトリウム(STPP)の存在下(図10角)及び非存在下(図10角)におけるSP 446 プロテアーゼの温度活性を示す図であり；

図3は、SP 446 プロテアーゼによるインスリンの切断を示し；

図4は、SP 446 プロテアーゼのアミノ酸配列を示し(ここでアミノ酸は独立された一文字コードで示している)；そして

図5は、乳タンパク質環状物のSP 446加水分解に由来する、精製、塩沈及び塩沈消費データを示す

より決定)として定義される；

カゼイン(ハマルステン(登録商標)、メルク社、ゲルムスタット、FRG)の2%(w/v)溶液を、グリソリンおよびロビンソン(J. Chem. Soc., 1931, p1431)によって記載されるユニバーサル緩衝液を用いて調製し、pH9.5に調節した。2mlの緩衝液を25℃で10分間水中で予じめインキュベートした。ユニバーサル緩衝液(pH9.5)1ml量り、約0.2~0.3cpcに相当する、精製1ml当り0.5gを含有する1mlの酵素溶液を添加する。25℃で30分間インキュベーション後、急速に17.9%の三塩化酢酸、2.9、9%の酢酸ナトリウムおよび19.8%の酢酸を含有し、脱イオン水で500mlとした溶液(5ml)を添加して反応を停止する。ブランクは、緩衝液と同様に調製するが、急速に酵素溶液の前に添加する。反応混合物を20分間水中で保持し、しかる後ワトマン42の濾紙で濾過する。この分析方法を記載するパンフレットは、要求によりノボルディスク社(デンマーク国)から入手できる。

第一アミノ基を、次の短く0-フルクトアルデヒド(OPA)を用いたそれらの濃度によって測定する；

1. 0.2gの固形トリポリリン酸ナトリウム10水和物および2.0gの7-フルクトアルデヒドナトリウムを150mlの水中に溶解する。次いで4mlのメタノールに溶解した160mgのOPAを、400μlのγ-メルカプトエタノールと共に添加し、次いで濁液を水で200mlにする。3mlのOPA試剤に、混合しながら、上記で得られた濁液400μlを添加する。340nmでの吸光度(OD)を約5分後に測定する。また、OPAテストを、100mlのユニバーサル緩衝液(pH9.5)中に10mgのセリンを有するセリン標準液を用いて行う。プロテアーゼ活性は次式を用いOD測定値から計算する；

$$\text{cpu / 酵素溶液 (ml)} : \frac{(OD_0 - OD_{\infty}) \times C_{\text{cell}} \times Q}{(OD_{\text{cell}} - OD_0) \times MW_{\text{cell}} \times t},$$

$$\text{cpu / 酵素製剤 (g)} = \text{cpu / ml} \times b$$

ここで、 OD_0 、 OD_{∞} 、 OD_{cell} および OD_0 はそれぞれ試料経路、ブランク、セリン標準液および反応液の光学濃度であり、 C_{cell} は標準液 (この場合 0.1 mg/ml) 中のセリン (mg/ml) の濃度であり、 MW_{cell} はセリン (105.09) の分子量である、 Q は酵素溶液に対する希釈因子 (この場合 5) であり、 t はインキュベーション時間 (分) (この場合 30 分) である。

pH 依存性

SP446 プロテアーゼの活性の pH 依存性を、上記の OPA カゼイン法で測定するか、恒し、ユニバーサル緩衝液を種々の pH 値、すなわち pH 5、7、8、9、10 および 11 に調整した。結果を図 1 に示す。この図から明らかなように、SP446 プロテアーゼは最適 pH は pH 8~10 の範囲に存在する。

温度依存性

SP446 プロテアーゼの活性の温度依存性を、上記の OPA カゼイン法で測定した。

恒し、酵素反応は、種々の温度、すなわち、15℃、30℃、40℃、50℃、60℃ および 70℃ で行い、酵素反応は、多くの商業上の試料中、通常の時期である 0.1% トリプシン配ナトリウム (STPP) の存在および非存在下で行った。結果を図 2 に示す。この図から SP446 プロテアーゼは、STPP の存在如何にかかわらず、約 50℃ で最適温度を有する。

G14 特性

SP446 プロテアーゼの G14 特性を次の如く測定した：
ユニバーサル緩衝液 (pH 9, 5, 同上) 中 1 mg/ml にトイン

完全アミノ酸配列を図 4 に示す。

このアミノ酸配列に基づいて、SP446 プロテアーゼの分子量は、23,600 であった。

OPAP による SP446 プロテアーゼの不溶性化

PMSP (インプロバノール中 1%) と共に酵素を 1 対 10 (容重比) の割合でインキュベーションすると、SP446 プロテアーゼの不溶性化は同様に生じなかった。しかし 0.1 の 10 mM MOPS (pH 7.2) および 1.0 の 0.1 M ジニアロピルホスホフルリテート (DPP) と共に 1.0 ml (1 mg/ml) の酵素を 60 分間インキュベーションすると、酪素 C2-phenol-ローグロ-NH₂ に関するその活性によって測定される如く、酵素の完全な不溶性化がもたらされた。

実験例 2

乳漿タンパク質の加水分解

800 ml の脱イオン水に溶解した 75 g のスプレー乾燥乳漿タンパク質 (Lactodan-20, デンマークプロテイン A/S, Nr. 7105, 8920 ビデバック, デンマークより入手可能) に、SP446 プロテアーゼおよび剛硬上のアトリアシン (Pancreas Tryptase Novo 6, 03, ノボルゲイスク社より入手可能、対照として用いる) の 100 g のタンパク質あたり 14.7 cpu をそれぞれ添加した。プロテアーゼを、インフュージョンシート No. B163 (1984 年) 1月、"Use of Food Grade Alkalase[®] or Neutrase[®] for controlled Enzymatic Hydrolysis of Proteins." と標識されたシート (ノボルゲイスク社より要求により入手可能) に記載の如きいわゆる pH-a1a 法により、乳漿タンパク質と共に、4 時間 65℃ でかつ pH 8.0 でインキュベーションした。乳漿タンパク質に対して測定された加水分解の程度は、SP446 では 12.

特表平5-505524 (6)

エリン 0.5 ml および同様に 75 ml の SP446 プロテアーゼ (0.6 cpu / 1) を、37℃ で 120 分間インキュベートした。50 ml の NHCl を添加して反応を停止した。

インシュリン分子を、多数のペプチド断片に分解した。これらを分離し、通常の C-18 カラム (ハイパー 9 クロマト R-P-18, メルク社製の 5 μm の粒子) を用い、逆相 HPLC により分離した。断片を次の割合で 60 分間こう配分離した。

A. 0.2 M の塩化ナトリウムおよび 0.1 M のリン酸；

pH 2.5；

B. アセトニトリル/水、50%；

線状グラジエントは 90% A / 10% B から 30% A / 70% B であった。

分離した断片を、アプライドバイオシステム (フォスター社、CA, USA) モデル 470 A 気相シーケンサーを用い、自動エドマン分解によりアミノ酸配列決定装置に導き、次いでフェニルチオヒダントイン (PTC) アミノ酸を、シ、チム等「Secretion of human insulin by a transformed yeast cell', *PNAS Letters* 212 (2), 1987, p.307」により記載される如く、HPLC により分析した。インシュリン分子の分解断片は、図 3 に示される如く測定される。

N-末端アミノ酸配列

酵素 SP446 プロテアーゼの N-末端アミノ酸配列を、次節で記載の如く決定した。N-末端配列は、次の如く決定した：

¹SVICSDDR⁵RY¹⁰TNT¹⁶TA²⁰YMT²⁶R-

完全アミノ酸配列

完全アミノ酸配列を DNA 配列から決定した。DNA 配列は、「発明の詳細な説明」の節で記載の如く標準的方法で決定した。完

1% であり、トリプシンでは 10.4% であって (％はタンパク質中のペプチド結合の全数から計算する)

SP446 に対する実験結果は、表 1 および図 5 に示される。

表 1

時間 分	粘度 mPa.s	Δ 粘度/濃度 mPa.s/g	粘度消費 ml 48 h
0	6.72	0	0
15	25.92	92	7.70
30	59.52	96	8.35
60	47.04	90	9.31
90	32.64	93	9.38
120	24.96	100	9.62
180	18.24	110	9.95
240	17.28	103	16.22

加水分解度は次式によって計算できる：

$$DH = \frac{\text{分解したペプチド結合の数}}{\text{ペプチド結合の全数}} \times 100$$

タンパク質中のペプチド結合の全数は、そのアミノ酸組成から計算できる。分解したペプチド結合の数は、トリプトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いた次の方法により水溶液中の O-アミノ基の分析から決定できる。

9.25 × 10⁻² ~ 2.5 × 10⁻² M のアミノ基 / 含有するリッブル 0.25 ml を、pH 8.2 のホスフェート緩衝液 2.00 ml と試管内で反応する 2 ml の 0.1% TNBS 溶液を添加し、次いで試管を振とうし、50 ± 1℃ の水浴中 30 分間保持する。インキュベーション中、試管および水浴をブルームーム箱でカバーする。と言うのは、ブランク反応が光により促進されるからである。60 分後、4.00 ml の HCl を添加して反応を停止させ、次いで 340 nm の水に対する分光密度を分光学的に読みとる前に試管を逆転して 30 分間放置する。詳細は、アブラーモソン (J. Agric. Food. Chem., 27, 1979, p.1256-1262) を参照のこと。

電くへをことに以下の内容が見出された。SP446による乳型タンパク質の加水分解は、反応混合物の粘度増加をもたらした。このことは、親水性であるグルタミン酸およびアスパラギン酸を含むペプチド結合に対するSP446プロテアーゼの特異性に起因するか、又は水解物中のプラスチン反応に起因するであろう。粘度増大（すなわち、加水分解が生起している）の一定増加にかかわらず、透過圧重量モル濃度は加水分解中一定には増加しないことは注目されるが、このことは酵素の加水分解中には通常起こるであろう。粘度は、最初の30分中に増加し、次いで透過圧重量モル濃度の増加が比較的ゆるやかになる同じ点でその最大に達する。

実施例2

SP446プロテアーゼを用いた大豆タンパク質の加水分解

4000mlの大豆タンパク質濃縮物の懸濁液（この懸濁液は約8%タンパク質（N X 6, 25）を含む）を、SP446プロテアーゼ（2700u/g 酵素のり、1%）および緩衝液上のトリプシン（パンタレラストリプシンNOVO 3, 0.5, ノルマルシス性より入手可能）（2%, 3, 300u/g）の混合物を用い、pH 8, 9 および 10 の温度で加水分解に供した。pH-スタット（S.T. 21）（ラジオメーター、コペンハーゲン、デンマーク国）を用いて監視した加水分解中、pHを4.0 NaOHを添加して一定に保持した。2時間加水分解後、加水分解度（先に定数）を測定し、14%を得た。次いで0.1N HClを添加して、pH 4.2にし酵素を失活させた。次いで、加水分解混合物を、助剤として塩化ナトリウムを用い、透析を通して上澄みをデカントする前に30分間放置した。原液を改修するため、上澄みを3~4秒間140°Cに加熱し、真空を真空室内にフラッシュした。更に、生成物をH.S.オルセルおよびJ.アルゲニヤン「Application of Ultra- and Hyperfiltration

特許平5-505824 (7)

tion 25 during production of enzymatically modified proteins, J

ASC Symp. Ser. 154, pp.133-169) に記載される如く脱脂した。

得られた水解物を、上記の如く調整したが、出し、1.0%のアルカラーゼ（Alcalase登録商標）2.4L（54人リ/8gタンパク質分解活性）に対するタンパク質の量に就いて計算）をタンパク質の加水分解に用いた。

かくして得られたタンパク質水解物（3.5%溶液）を、香味に対する通常の三角試験において比較した。主張者は、二者の生成物の香味における差異は著しいものであると判断し、更にSP446およびトリプシンで固定した水解物を併用したものとした。

SP446および商業上のトリプシンの混合物を用いた大豆タンパク質濃縮物の加水分解は、反応混合物の粘度増加をもたらした。このことは、親水性であるグルタミン酸およびアスパラギン酸を含むペプチド結合に対するSP446プロテアーゼの特異性に起因するか、又は水解物中のプラスチン反応に起因するであろう。

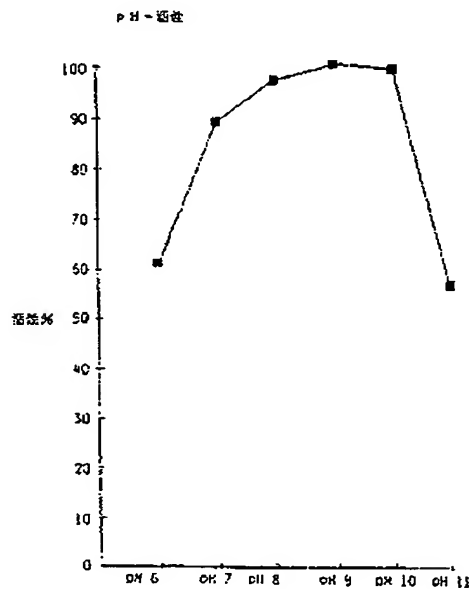


Fig. 1

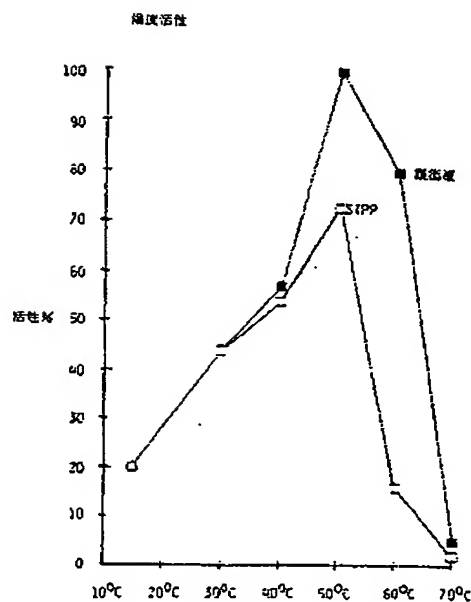


Fig. 2

物表平5-505524 (8)

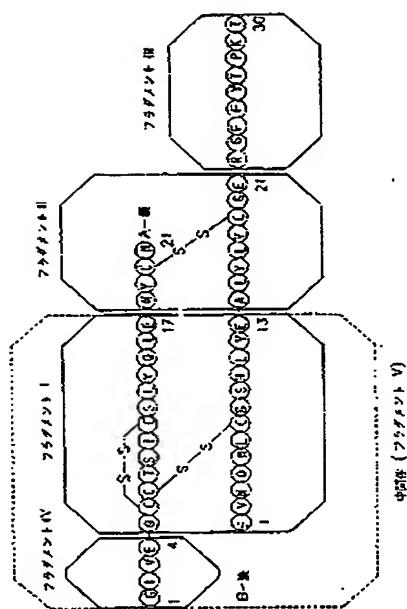


Fig. 3

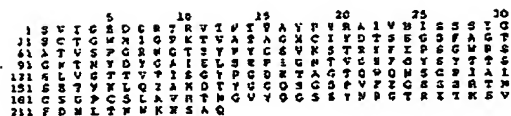


Fig. 4

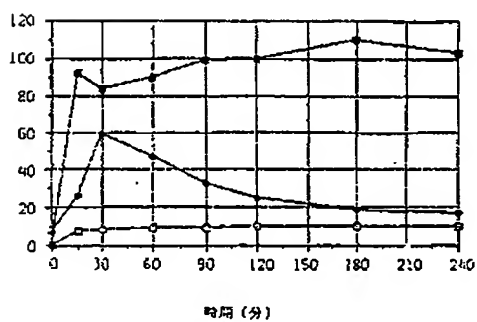


Fig. 5

买 均 否

本発明は、タンパク質の限定された特異的な加水分解を得るための方法、該方法によって得られる水解物およびタンパク質水解物を含有する食品に関する。

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の2)

特許平5-505524 (9)

請求の範囲

平成4年9月9日

特許庁長官 麻 政 政 政

1 特許出願の請求

PCT/DK91/00069

2 発明の名称


タンパク質加水分解薬

3 特許出願人

住 所 デンマーク国、デーヨー-2800 バグスバエルト、
ノボ アレ (普通名)

名 称 ノボ ノルディスク アクティブゼルスラブ

4 代理人

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号野光院ノ門ビル
〒105 電話 (3504) 0781氏 名 丹野 玄 (5573) 青 木 剛 (外3名) 

5 補正書の提出年月日

1992年2月21日

6 添付書類の目録

補正書の翻訳文



1通

a-v-i-a-s-d-d-c-c-r-v-l-a-l-s-
a-y-p-y-r-a-i-v-h-i-s-a-s-i-s-
s-c-l-g-w-m-l-g-p-k-l-u-a-l-s-
g-h-c-i-f-y-d-l-s-s-g-a-f-a-g-l-
a-l-v-s-p-g-r-h-g-l-s-y-p-y-g-
s-y-k-a-c-r-y-f-l-p-s-g-w-r-g-
g-n-l-n-y-d-y-g-a-i-a-l-a-a-p-
i-g-a-l-v-g-y-f-g-y-s-y-l-l-s-
s-l-v-g-s-l-y-e-l-s-g-y-p-g-d-
k-l-a-g-l-q-w-q-h-s-g-p-i-a-i-
s-e-l-y-k-l-q-y-a-m-d-l-y-g-g-
q-s-g-s-p-v-i-g-g-s-s-r-l-a-
c-s-g-p-c-s-l-a-v-h-l-a-g-v-y-
g-g-s-s-y-a-r-g-l-r-l-l-k-e-v-
f-d-a-l-l-n-w-k-d-s-a-q

を有する請求の範囲第1項記載の方法。

3. a)を、タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーション中、一定に保持する、請求の範囲第1項記載の方法。

4. タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーションを、非pH-stat法によって行う、請求の範囲第1項記載の方法。

5. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば乳清タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、またお米タンパク質、ひらききまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の実タンパク質又はごまの実タンパク質から成る群から選ばれる、請求の範囲第1項記載の方法。

1. Glu及び/又はAsp割合でのタンパク質の規定された特異的な加水分解を降るための方法であって、以下の特徴を有する請求：

(a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；

(b) これは1gの酵素タンパク質当たり少なくとも2.5cpa (カゼインプロテアーゼ単位) の比活性を有する；

(c) これは約23, 800の見かけ上の分子量を有する；

(d) これはジソプロピルホスホフルオリドによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない；

(e) これは6, 5~10, 0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す；

(f) これは、B. subtilis (Licheni-fossilis) の株によって産生されるものである；

を含んでなり、その他のタンパク質分解酵素と實質時に有さない酵素調製品をタンパク質性物質に加え、次いで所望の加水分解の程度が得られるまで中性又は弱いアルカリ性のpHにてインキュベーションし、その後該酵素を適切に不活性化せしめることによってこのインキュベーションを終了させ、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、前記方法。

2. タンパク質分解酵素が、確立された一文字コードで示される次のアミノ酸配列：

6. タンパク質性物質に加えられるべき酵素の量が、0.05~1.5cpa /タンパク質100g、特に0.1~5cpa /タンパク質100gの範囲内にある、請求の範囲第1項記載の方法。

7. 酵素を、インキュベーション混合物の濃度を約70℃に高めることにより、又はインキュベーション混合物のpHを約5, 0未満に下げることにより不活性化する、請求の範囲第1項記載の方法。

8. 第一のタンパク質分解酵素に加え、他のタンパク質分解酵素をタンパク質性物質に加える、請求の範囲第1~7項のいずれかに記載の方法。

9. 他のタンパク質分解酵素が、トリプシンおよびトリアプシンへドプロテアーゼから成る群から選ばれる、請求の範囲第8項記載の方法。

10. 第一のタンパク質分解酵素が、0.05~5cpa /タンパク質100gの範囲内の量で加えられ、さらに第二のタンパク質分解酵素が、0.1~10cpa /タンパク質100gの範囲内の量で加えられる、請求の範囲第8項記載の方法。

11. タンパク質加水分解薬であって、以下の特徴を有するタンパク質分解酵素：

(a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；

(b) これは1gの酵素タンパク質当たり少なくとも2.5cpa (カゼインプロテアーゼ単位) の比活性を有する；

(c) これは約23, 800の見かけ上の分子量を有する；

(d) これはジソプロピルホスホフルオリドによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない；

豫表平5-505524 (10)

(c) これは 6.5 ~ 19.0 の pH の範囲においてその最大活性の 75% 以上を示す:

(1) これは、B. リシェニホルミス (B. licheniiformis) の実質株を含む、バシラス リシュマホルミス (Bacillus licheniiformis) の株によって生じられるものである。

を合せて成り、その他のタンパク質分解活性を実質的に有さない
酵素製剤によるタンパク質のG1₀及び/又はA₁₀結合の特異
的な加水分解の結晶として、C-末端にグルタミン酸又はアス
パラギン酸残基を有するペプチドより実質的に成る、弱陽性タンパク
加水分解剤。

12. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば鶏卵タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、赤血球、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、またはタンパク質、むかしきうまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の実タンパク質又はごま油タンパク質から低分子から遊ばれる、請求の範囲第11項記載のタンパク質加水分解物。

13. 高圧比の1000-20,000の範囲、または1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと、高圧比の約100未満の分子量を有するペプチドを含んで成る、硬質の組成物。1) 硬質のタンパク質と水分解物。

14. タンパク質 Glu および / 又は Asp 結合の特異的加水分解の結果としての C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質の Leu および / 又は Arg 結合の特異的加水分解の結果としての C-末端に Lys および /

又はA : g 級益を有するペプチドを含んでなる、請求の範囲第1項記載のタンパク質加水分解物。

15. 高い比容の分子量2000-10,000を有するペプチドおよび高い比容の分子量約1000未満を有するペプチドを合入する。採取の範囲は14吸収型のタンパク質加水分解物。

18. 前求の範囲第11～13項のいずれかに記載のタンパク質加水分解物を含んでなる食品。

17. 陸産の穀類第14又は15項に記載のタンパク質加水分解物を含んでなる食品。

19. 2種以上の脂肪源および/又は1種以上の炭水化物源を、更に含んでゐる、請求の範囲第16又は17項記載の食品。

● ● ● ● ●

[illegible]

UNCLASSIFIED//FOR OFFICIAL USE ONLY

12.	Bibliography (author, title, date, publisher, etc.)	13.
Z	J. Apple, Food Chem., Vol. 36, 1958 (see MacChesney et al: "Solubility and Gasification Properties of Cereals Modified Enzymatically by Staphylococcus aureus 98 Protease". see entry 220 = page 224 especially 220 ..	1-20
Y	Z. Lebensm. Unters.-Verf., Vol. 150, 1976 (Herbert Frieder et al: "Zusammenhang zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden". see page 352 = page 356 ..	1-20
A	US. A. 4100824 (AOKI-MISEN) 31 July 1978, see column 1, line 29 = line 38	1-20
A	US. 3, 4866023 (TAYL ET AL) 8 May 1985, see claim 1 ..	1-20
A	US. 3, 4507314 (GRIFFIN C. JOLEY) 15 August 1978, see column 2, line 21 = line 35; column 4; abstract ..	1-20

特表平5-505524 (11)

国際特許公告

PCT/DK 91/00069

For a copy of this document, please apply to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, 358, Avenue de la Gare, 1202, Geneva, Switzerland. The International Bureau of the World Intellectual Property Organization is also available on the Internet at the following address: <http://www.wipo.int/patents>

Patent number of the country of origin	Priority date	IPC Class. by subclass	IPC Class. by subclass
EP-A2- 0129786	89-09-02	AU-D- 2004499	89-09-23
		JP-A- 2005539	90-01-16
EP-A1- 0255239	97-02-28	AU-D- 3018139	90-01-25
EP-A1- 0304303	90-08-23	CI-A- 3825394	90-02-29
NO-A1- 8703706	87-03-02	AU-B- 291236	85-11-30
		AU-D- 6834687	87-07-19
		EP-A- 0834787	87-07-23
		EP-A- 0276211	87-09-24
		EP-A- 0546051	88-01-07
		JP-T- 02962003	08-09-11
		JP-T- 02500009	85-09-11
		NO-A- 87-01725	87-07-02
US-A- 4300024	78-05-11	DE-A- 850470	77-07-10
		FR-A- 2332991	77-08-12
		GB-A- 1547931	79-06-27
		JP-E- 1112697	84-09-16
		JP-A- 52114496	77-09-24
		JP-T- 56027471	81-10-12
		NO-A- 7700527	77-07-21
US-A- 4206531	81-05-09	DE-A- 374426	80-01-03
		DE-A- 642275	84-04-13
		DE-A- 2726878	80-01-17
		EP-A- 0606528	80-01-07
		FR-A- 2430193	80-05-01
		GB-A- 2024830	80-01-16
		JP-A- 7025722	80-01-08
		SE-A- 647651	80-12-03
US-A- 4197394	78-09-15	DE-A- 759635	78-04-12
		DE-A- 1864807	81-02-03
		DE-A- 2745554	70-04-29
		FR-A- 2367772	78-05-12
		GB-A- 1530993	70-03-29
		JP-A- 53047565	78-04-18
		LU-A- 78234	79-06-01
		NL-A- 7110511	78-04-17
		SE-A- 7110423	78-04-14

第1頁の続き

Int. Cl.	識別記号	市内整理番号
C 12 P 21/08		8214-4B
A 23 J 3/08		7236-4B
		7236-4B
		7236-4B
C 12 N 9/56		7823-4B
(C 12 N 9/56		
C 12 R 1:10)		

優先権主張 ◎1991年2月6日◎デンマーク(DK)◎199/91

◎発明者 モルテンセン, ステーン ペン デンマーク国, デーヨー-2880 ハグスバエルト, 1. デーベ
ニケ, アルデルシビレバイ 131,◎発明者 ブソフ, ベテル デンマーク国, デーヨー-2000 フレデリクスベルグ, ホフメヤル
スパイ 21

◎発明者 エリクセン, スベント デンマーク国, デーヨー-3450 アレロエト, デルフィンバイ 8

特表平5-505524

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)12月8日

【公表番号】特表平5-505524

【公表日】平成5年(1993)8月19日

【年道号数】

【出願番号】特願平3-506279

【国際特許分類第6版】

A23J 3/34

3/08

3/10

3/16

A23L 1/305

C12N 9/56

C12P 21/06

//C12N 9/56

C12R 1:10)

【F I】

A23J 3/34

3/08

3/10

3/16

A23L 1/305

C12N 9/56

C12P 21/06

特表平5-505524

こ、１）および／または１）組合でのタンパク質の特定の位置での修飾として
 のくー基にヒスチジンおよび／またはトリプトファン残基を付するペプチドを含む。請求項
 １）に記載のタンパク質は分解性。

１５．あるいはアミノ酸残基（１）と（２）の、（１）を付するペプチドおよび／
 しくは（２）を付するペプチドを含む。請求項１）に記載のタン
 プロテイン分解性。

１６．請求項１）～１５）のいずれか１項に記載のタンパク質は分解性を含む。
 の食品。

１７．請求項１）～１５）に記載のタンパク質は分解性を含む食品。

１８．１）～１５）のいずれか１項に記載のタンパク質は、更に含む、同
 定または１）～１５）に記載の食品。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.